# MycAssay™ Aspergillus
## Roche LightCycler® 2.0
## Suero
**REF 080-045**

## Uso previsto

MycAssay™ Aspergillus está indicado para su uso por profesionales de laboratorio cualificados para la detección cualitativa del DNA genómico de *Aspergillus* spp. extraído del suero como ayuda para el diagnóstico de la aspergilosis invasiva.

MycAssay™ Aspergillus (Suero) ha sido validada para usarse con el Roche LightCycler® 2.0.

## Resumen y explicación

El género *Aspergillus* está constituido por mohos oportunistas ubicuos que causan síndromes tanto alérgicos como invasivos. Este género comprende aproximadamente 300 especies, de las cuales 41 se han asociado a enfermedades humanas. La mayoría de las patologías son causadas por *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger*; menos frecuentemente por *A. nidulans*, y otras especies poco comunes como *A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus y A. pseudofischeri* también se han implicado[1]. La mayoría de las patologías causadas por *Aspergillus* spp. afectan al tracto respiratorio. La aspergilosis invasiva (AI) se desarrolla en grupos de pacientes de riesgo entre los que se incluyen aquéllos pacientes que están recibiendo tratamiento contra la leucemia y el linfoma, los que han recibido un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) o de órganos sólidos, así como aquéllos pacientes tratados con corticosteroides y los que presentan neutropenia o disfunción fagocítica (por ejemplo, la enfermedad granulomatosa crónica y la infección por el VIH).

Los índices de infección fúngica invasiva (IFI) son casi siete veces mayores en los pacientes que han recibido un trasplante TCPH alogénico que en los pacientes que han recibido un trasplante autólogo y la aspergilosis invasiva (AI) es responsable de aproximadamente la mitad de las infecciones[2]. La mayoría de las veces, la aspergilosis se limita a la fase neutropénica post-trasplante temprana en pacientes TCPH autólogos. Los pacientes TCPH alogénicos presentan un riesgo mayor durante períodos más largos (no sólo hasta, sino más allá de los 100 días) debido a la mayor frecuencia de aparición de la EICH y a la recuperación lenta de las células T. En los pacientes sometidos a quimioterapia para el tratamiento de la leucemia aguda o a tratamientos de último recurso para la leucemia o el linfoma recidivante, la AI es una de las causas principales de mortalidad.

La Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC) y el Grupo de Estudio de las Micosis (MSG) han revisado y publicado definiciones de consenso sobre las infecciones fúngicas invasivas, incluyendo criterios definidos para el diagnóstico de la AI probada, probable y posible en pacientes con malignidad hematológica o tras un TCPH[3]. Actualmente, los criterios para una “AI probable” incluyen un factor del huésped más un criterio clínico y una prueba microbiológica. El diagnóstico de una “AI probable” no requiere un criterio microbiológico. Las pruebas microbiológicas aceptadas en los criterios de una “AI probable” incluyen una prueba ELISA basada en suero que detecta la presencia del galactomanano (GM). Se recomienda realizar dos pruebas de galactomanano (GM) positivas consecutivas para mejorar la precisión diagnóstica.

En un metaanálisis realizado por Mengoli et al se examinaron >10.000 muestras de sangre, suero y plasma procedentes de 1.618 pacientes con riesgo de padecer AI. Se calculó que la sensibilidad y especificidad de una única muestra de sangre positiva a la PCR era respectivamente de 88% (IC del 95% 75% - 94%) y de 75% (IC del 95% 63% – 84%) y que el cociente de posibilidades diagnóstico (*diagnostic odds ratio*) para casos probados y probables era de 16,41 (IC del 95% 6,43 – 41,88)[4].

[1] Base de datos de especies en www.aspergillus.org.uk
[2] Kontoyiannis DP et al Clin Infect Dis 2010: 50(8); 1091-1100
[3] Ascioglu S et al Clin Infect Dis 2002: 34; 7-14
[4] Mengoli C. et al The Lancet ID 2009: 9; 86-96

MycAssay™ Aspergillus es un kit de diagnóstico molecular para la detección del DNA genómico del género *Aspergillus* mediante la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real con baliza molecular[5]. El procedimiento completo del ensayo, incluida la extracción de DNA de la muestra clínica, puede realizarse en aproximadamente 2½ horas, mientras que el cultivo de hongos puede requerir varios días para generar resultados positivos. Este ensayo ofrece ventajas sobre los métodos de diagnóstico actualmente disponibles para la aspergilosis pulmonar invasiva aguda y para la aspergilosis pulmonar crónica. Estas ventajas incluyen una detección más rápida de *Aspergillus* spp. y la posibilidad de un aumento en la sensibilidad para *Aspergillus* spp. en pacientes con el sistema inmune altamente comprometido que se sospecha que tienen aspergilosis invasiva.

## Principios del procedimiento

Después de mezclar los reactivos del kit MycAssay™ Aspergillus con una muestra que contenga la secuencia diana de DNA de *Aspergillus* (una sección del gen ribosómico 18S de *Aspergillus*), se producirá la amplificación del DNA mediante un proceso de termociclado. El ensayo también contiene un control de amplificación interno (IAC, *internal amplification control*), que es un fragmento de DNA que no está presente en el genoma de *Aspergillus* ni en otros genomas fúngicos, ni tampoco en genomas bacterianos ni humanos, y cuya finalidad es detectar sustancias inhibidoras de la PCR y confirmar la funcionalidad de los reactivos del ensayo.

Las dianas de DNA amplificadas se detectan por medio de la tecnología de balizas moleculares. Las balizas moleculares son sondas de hibridación compuestas de un oligonucleótido de cadena sencilla que forma una estructura de horquilla. La porción curva de la horquilla contiene una secuencia sonda que es complementaria de una secuencia diana, y la porción recta de la horquilla está formada por hibridación de secuencias de brazo complementarias que se encuentran a cada lado de la secuencia sonda. Un extremo del brazo está unido de forma covalente a un fluoróforo, que emite fluorescencia cuando es excitado por una luz de la longitud de onda apropiada, mientras que el otro extremo del brazo está unido de forma covalente a un extintor de fluorescencia, que suprime la fluorescencia del fluoróforo cuando se encuentra en estrecha proximidad física. Las balizas moleculares no emiten fluorescencia cuando están libres en solución. Sin embargo, cuando se hibridan con una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, experimentan un cambio conformacional que las separa físicamente del fluoróforo y del extintor de fluorescencia, lo cual les permite emitir fluorescencia al ser excitadas. La cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo dado, o después del ciclo, depende de la cantidad de amplicones específicos que están presentes en ese momento. El sistema de PCR en tiempo real mide simultáneamente la fluorescencia emitida por las balizas.

## Precauciones

- El kit está diseñado para ser usado exclusivamente por profesionales de laboratorio. Es preciso poner en práctica procedimientos para la manipulación de muestras que no generen aerosoles. Deben seguirse las precauciones habituales y las directrices del centro para la manipulación de todas las muestras. Myconostica Ltd. tiene a su disposición una Hoja de datos sobre la seguridad de los materiales.
- Este ensayo es solamente para diagnóstico *in vitro*
- En estudios de validación analíticos se mostró que los niveles de transaminasa de 22,2 U por 0,5 mL de suero tenían un posible efecto de degradación sobre el DNA de *Aspergillus*.
- Este ensayo se ha validado con suero recogido en tubos para la recogida de suero “Greiner Red Top”. Otros tubos para la recogida de suero o de sangre pueden contener sustancias inhibidoras o competidoras que todavía no se han estudiado.
- Este ensayo se ha validado para las muestras de suero. No se dispone de datos de validación para plasma o sangre completa.
- Este ensayo se debe utilizar exclusivamente con el Roche LightCycler® 2.0 y el software LightCycler® v4.1.
- No use los reactivos ni los controles si las bolsas protectoras llegan abiertas o rotas.
- Los reactivos y los controles no son intercambiables entre kits con números de lote diferentes.
- Nunca mezcle reactivos ni controles de tubos diferentes, aunque sean del mismo lote.
- Nunca use los reactivos ni los controles después de su fecha de caducidad.
- Los reactivos y los controles no deben volver a congelarse ni a utilizarse una vez abiertos.
- Use ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos del kit.
- Asegúrese de que todos los reactivos no incluidos no estén contaminados por hongos.
- Para evitar la contaminación con amplicones del IAC o *Aspergillus*, no abra los tubos de reacción después de la amplificación.

[5] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Evite la contaminación microbiana y con desoxirribonucleasa (DNAasa) de los reactivos cuando tome muestras parciales de los tubos.
- Se recomienda usar puntas de pipeta de desplazamiento positivo o con filtro desechables de baja retención, libres de DNAasa y estériles.
- Use una nueva punta para cada muestra o reactivo.
- Deseche los reactivos no usados y el material de desecho de acuerdo con las normativas nacionales, federales, estatales y locales.
- Pueden analizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o las normativas locales, estatales, provinciales y federales o de las organizaciones responsables de la acreditación.
- No coma, beba ni fume en áreas donde se manipulen las muestras o los reactivos del kit.
- Puede almacenar el suero durante un máximo de 48 horas en una nevera (2 a 8ºC) o en un congelador (-15 a -25ºC).
- Las concentraciones bajas de DNA pueden ser inestables si no se conservan correctamente. Se recomienda almacenar las extracciones de DNA de muestras clínicas a una temperatura de -80 $^{o}$C para preservar su integridad. Siempre que sea posible debe evitarse también realizar varias secuencias de descongelación y congelación.

## Contenido del kit

Descripción

El kit consta de cinco bolsas selladas de aluminio con 3 compartimentos cada una que se pueden sacar de la caja y usar por separado. Cada bolsa contiene reactivos suficientes para 8 reacciones.

| | | Volumen |
|---|---|---|
| **Tubo 1** (tapón naranja) | dNTPs<br>$MgCl_2$<br>Solución amortiguadora del complejo de la DNA polimerasa | 66 µL |
| **Tubo 2** (tapón verde) | < 0,01% de cebadores<br>< 0,01% de balizas moleculares<br>< 0,0001% de control de amplificación interno (IAC)<br>El control de amplificación interno es un plásmido de DNA recombinante que contiene una secuencia no infecciosa no relacionada con la secuencia diana (*Aspergillus*).<br>Amortiguador Tris-HCl | 66 µL |
| **Tubo 3** (tapón transparente) | Control negativo<br>Agua | 25 µL |
| **Tubo 4** (tapón negro) | Control positivo<br>< 0,0001% de DNA de control positivo<br>La molécula de control positivo es un plásmido recombinante que contiene la secuencia diana de *Aspergillus*.<br>Amortiguador Tris-HCl | 25 µL |

El kit también contiene:

- CD-ROM *MycAssay™ Aspergillus Myconostica Protocol* (Protocolo del ensayo *MycAssay™ Aspergillus* de Myconostica)
- Instrucciones de uso
- Certificado de análisis

## Conservación

El kit debe guardarse congelado (a una temperatura de -15 °C a -25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del kit, momento en el cual debe desecharse de acuerdo con la normativa local.

Una vez abierta una bolsa, debe usarse su contenido inmediatamente; no se puede volver a congelar ni a reutilizar más adelante.

## Equipo y materiales necesarios pero no incluidos

- Sistema de PCR en tiempo real Roche LightCycler® 2.0 (incluyendo el manual de usuario, ordenador asociado y software LightCycler® v4.1)
- Centrifugadora de carrusel LightCycler® 2.0 (opcionalmente adaptadores para tubos capilares para minicentrifugadora)
- Carrusel de muestras para tubos capilares *de* 20 µL
- Tubos capilares LightCycler® 2.0 de 20 µL con tapones
- Gradilla de soporte para tubos capilares
- Liberador de tubos capilares
- Herramienta de taponamiento
- Microcentrifugadora
- Agitadora vorticial (vórtex)
- Micropipetas (volúmenes requeridos: 7,5-20 µL)
- Puntas con filtro de baja retención estériles
- Guantes desechables sin polvo
- Solución comercial descontaminante de DNA
- Kit de aislamiento de DNA (véase más adelante)
- Kit MycAssay™ CC (véase más adelante)

## Muestra

La muestra para el ensayo MycAssay™ Aspergillus es DNA genómico total extraído de muestras de suero. Se recomienda con este fin el siguiente equipo y kit de extracción de DNA, utilizados durante la validación:

- Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Diagnostics, nº de catálogo 11 796 828 001)
- Solución de proteinasa K (Sigma Aldrich Chemicals, nº de catálogo P4850-5ML)
- 2-Propanol (Sigma Aldrich Chemicals, nº de catálogo 19516-25ML)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, EE. UU.)

## Kit MycAssay™ Colour Compensation (CC)

El análisis preciso de los datos producidos con el ensayo MycAssay™ Aspergillus requiere la aplicación de un archivo de compensación del color generado mediante el kit Myconostica MycAssay™ CC. Cuando se haya creado, el archivo se puede aplicar a múltiples series analíticas en el mismo aparato. Para más detalles póngase en contacto con su distribuidor local.

## Notas del procedimiento

- Lea el protocolo completo antes de comenzar.
- El proceso completo del ensayo MycAssay™ Aspergillus (incluida la extracción de DNA) dura aproximadamente 2½ horas, según el número de muestras analizadas.
- La preparación de la prueba debe realizarse en una zona de trabajo específica para PCR o en un laboratorio de procedimientos previos a la PCR. Si no se dispone de una zona de trabajo específica para PCR, la prueba debe realizarse en un área del laboratorio dedicada[7], separada de las áreas utilizadas para la extracción de DNA y que se limpie periódicamente con agentes descontaminantes de DNA.
- No obstante, evite el uso de reactivos descontaminantes de DNA cuando esté realizando la preparación del sistema de PCR en tiempo real, ya que pueden inhibir el ensayo.
- Utilice micropipetas para transferir líquidos. Deben utilizarse micropipetas de uso exclusivo para la preparación de estas reacciones; estas micropipetas deben descontaminarse con regularidad.
- Se recomienda utilizar puntas con filtro de baja retención para asegurarse de que no se pierda DNA durante el procedimiento de preparación.
- **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene material de DNA de control positivo y la contaminación podría dar lugar a resultados positivos falsos en la prueba.**
- Use guantes en todo momento.
- Todos los tubos de reactivos deben cerrarse después de usarlos y antes de desecharlos.

[7] Por ejemplo, véase Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

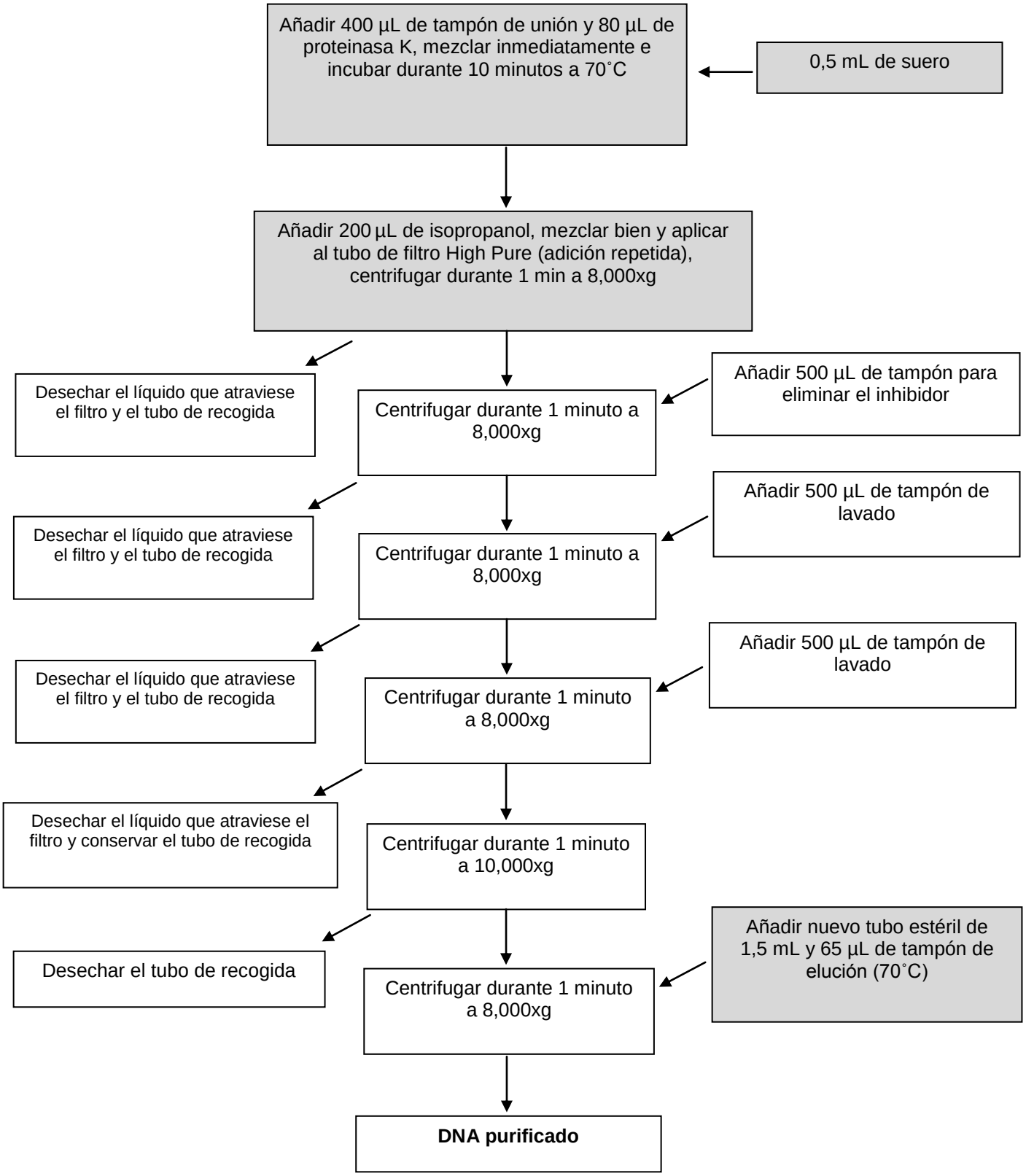
- Anote con exactitud las posiciones de los tubos capilares (en el carrusel de 32 posiciones) con los números correspondientes de identificación de las muestras en el plan del experimento.
- El análisis preciso de los datos requiere la aplicación de un archivo de compensación del color generado mediante el kit Myconostica MycAssay™ CC.

## Procedimiento de uso

El procedimiento está dividido en dos fases: extracción del DNA del suero y después PCR en tiempo real. La extracción del DNA se realiza mediante el kit High Pure PCR Template Preparation (kit High Pure). El kit High Pure está diseñado para purificar los ácidos nucleicos de diversos tipos de muestras. El protocolo de extracción detallado en estas instrucciones de uso, ha sido optimizado para aislar el DNA de *Aspergillus*.spp del suero y es adecuado para el uso con el kit MycAssay™ Aspergillus Suero.

NOTA IMPORTANTE: Se han modificado las instrucciones del fabricante para mejorar el rendimiento del DNA recuperado de una muestra de suero y la sensibilidad de la prueba. Determinados reactivos especificados en los pasos 1 y 2 de la Sección 2.3 de las instrucciones de uso del kit High Pure se agotarán antes que otros y se deberán sustituir. Durante el proceso de validación se utilizó la proteinasa K de Sigma Aldrich.

**Protocolo de extracción – las áreas sombreadas identifican los pasos que se han modificado con respecto a las instrucciones del fabricante.**


Añadir 400 µL de tampón de unión y 80 µL de proteinasa K, mezclar inmediatamente e incubar durante 10 minutos a 70˚C
0,5 mL de suero
Añadir 200 µL de isopropanol, mezclar bien y aplicar al tubo de filtro High Pure (adición repetida), centrifugar durante 1 min a 8,000xg
Desechar el líquido que atraviese el filtro y el tubo de recogida
Centrifugar durante 1 minuto a 8,000xg
Añadir 500 µL de tampón para eliminar el inhibidor
Desechar el líquido que atraviese el filtro y el tubo de recogida
Centrifugar durante 1 minuto a 8,000xg
Añadir 500 µL de tampón de lavado
Desechar el líquido que atraviese el filtro y el tubo de recogida
Centrifugar durante 1 minuto a 8,000xg
Añadir 500 µL de tampón de lavado
Desechar el líquido que atraviese el filtro y conservar el tubo de recogida
Centrifugar durante 1 minuto a 10,000xg
Desechar el tubo de recogida
Centrifugar durante 1 minuto a 8,000xg
Añadir nuevo tubo estéril de 1,5 mL y 65 µL de tampón de elución (70˚C)
DNA purificado

## 1. Preparación del sistema de PCR en tiempo real

1.1 Para comenzar, encienda el sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 2.0 (el instrumento, el ordenador asociado y la centrifugadora) e inicie el software correspondiente. Introduzca el nombre de usuario y la contraseña requeridos y seleccione la base de datos diagnóstica. Si se trata de la primera serie analítica del día, realice primero una autocomprobación del instrumento antes de iniciar una serie analítica.

1.2 **Recuerde:** se debe realizar una serie analítica de compensación de color antes de analizar los resultados de MycAssay™ Aspergillus en el LightCycler® 2.0. No obstante, no es necesario realizar la serie analítica antes de utilizar este producto y podrá realizarla y aplicarla a este archivo de series analíticas más tarde.

1.3 Asegúrese de que se haya limpiado el área de trabajo con reactivos descontaminantes de DNA y de que se haya dejado secar completamente; evite usar estos productos durante la preparación del ensayo, ya que un exceso de solución limpiadora puede inhibir la PCR.

1.4 Una bolsa contiene un tubo de cada tipo: Tubo 1, Tubo 2, Tubo 3 y Tubo 4. Hay suficientes reactivos en una bolsa para realizar 8 reacciones. Deben realizarse al menos una reacción de control positivo y una reacción de control negativo en cada serie analítica en la que los reactivos sean del mismo lote del kit. Por lo tanto, con una bolsa se pueden analizar 6 muestras de paciente. Si es necesario analizar más de 6 muestras, se puede usar más de una bolsa si las bolsas usadas proceden del mismo kit. No obstante, en una serie analítica el LightCycler® 2.0 sólo puede contener un máximo de 32 muestras. Por consiguiente, se pueden procesar un máximo de 30 muestras de paciente en una serie analítica (4 bolsas).

1.5 Calcule el número de reacciones necesarias; para ello, consulte la tabla siguiente:

| Número de bolsas | Número máximo de muestras de paciente |
|---|---|
| 1 | 6 |
| 2 | 14 |
| 3 | 22 |
| 4 | 30 |

1.6 Saque el número apropiado de bolsas del congelador. No use ninguna bolsa que ya no esté sellada. Si se congelaron las muestras de paciente después de la extracción, sáquelas también del congelador.

1.7 Rasgue el número de bolsas necesarias para abrirlas y saque los tubos. Si se va a usar más de una bolsa, pero solamente se va a procesar un conjunto de controles positivo y negativo, sólo es necesario extraer los Tubos 3 y 4 de una bolsa. **Deben tomarse precauciones al manipular el Tubo 4. Este tubo contiene material de DNA de control positivo y la contaminación podría dar lugar a resultados positivos falsos del paciente.**

1.8 Deje que se descongele el contenido de los tubos colocándolos en el banco de laboratorio durante 5-10 minutos, asegurándose de que se haya descongelado totalmente el contenido de todos los tubos antes de continuar. Mezcle en la agitadora vorticial el contenido de los tubos y las muestras de paciente y, a continuación, centrifúguelos en una microcentrifugadora mediante un ciclo corto para asegurarse de que todo el contenido se acumule en el fondo de los tubos antes de usarlos.

1.9 Coloque el número requerido de tubos capilares de 20 µL en una gradilla de soporte para tubos capilares. Tenga cuidado de no dejar ninguna marca en el vidrio.

1.10 Siempre debe prepararse primero el control negativo, seguido de las muestras de paciente. El control positivo debe prepararse siempre en último lugar.

1.11 En la siguiente tabla se muestran los volúmenes de reactivo y de DNA:

| Reactivo | Reacción | | |
|---|---|---|---|
| | **Control negativo** | **Muestras de paciente** | **Control positivo** |
| **Tubo 1 (tapón naranja)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tubo 2 (tapón verde)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tubo 3 (tapón transparente)** | 10 µL | - | - |
| **Muestras de paciente** | - | 10 µL | - |
| **Tubo 4 (tapón negro)** | - | - | 10 µL |
| Volumen total | 25 µL | 25 µL | 25 µL |

1.12 Añada los reactivos en el orden mostrado en la tabla anterior: Tubo 1 y luego el Tubo 2, seguidos de la plantilla (control negativo, muestra de paciente o control positivo). Tenga cuidado al tomar muestras parciales del Tubo 1, ya que el líquido es viscoso y puede adherirse al borde interno del tubo. Si sucediese esto, vuelva a centrifugar para acumular el contenido final en la base del tubo antes de intentar extraer las muestras parciales finales.

1.13 Use una nueva punta de pipeta para cada transferencia de líquido. Vuelva a cerrar los tubos de reactivos después de usarlos y deséchelos inmediatamente, así como el contenido restante, en un recipiente de cierre hermético para residuos clínicos. Los reactivos no usados no pueden guardarse para un uso posterior.

1.14 Tome precauciones especiales al pipetear el Tubo 4 (DNA de control positivo) para asegurarse de que no contamine ninguna otra reacción. Cierre los tapones de los otros tubos capilares antes de abrir el Tubo 4 para reducir el riesgo de contaminación cruzada.

1.15 Utilice la herramienta de taponamiento para cerrar cuidadosamente los tubos capilares con los tapones suministrados en la caja de tubos capilares. Asegúrese de que los tubos capilares estén firmemente cerrados. Si se desea, los tubos capilares se pueden cerrar cuando se haya añadido la plantilla a la reacción para reducir la posibilidad de una contaminación cruzada/ambiental.

1.16 Si no dispone de una centrifugadora de carrusel LightCycler® 2.0, centrifugue las muestras con los adaptadores para tubos capilares suministrados en una gradilla de soporte para tubos capilares mediante una minicentrifugadora. En caso contrario, continúe con el paso 1.17.

1.17 Transfiera con sumo cuidado todos los tubos capilares al carrusel de muestras en exactamente el mismo orden que se encuentran en la gradilla de soporte para tubos capilares, comenzando por el primer tubo capilar en la posición 1, y continúe en orden ascendente sin dejar huecos. Presione cada tubo capilar hacia abajo hasta que esté firmemente insertado.

1.18 Si todavía no ha centrifugado las muestras en la sección 1.16, centrifúguelas mediante la centrifugadora de carrusel LightCycler® 2.0.

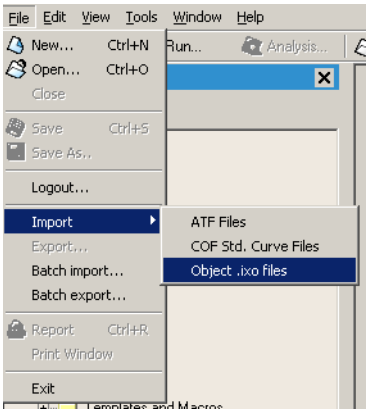
1.19 Continúe en la Sección 2 inmediatamente. Las reacciones del ensayo MycAssay™ Aspergillus son estables en el banco durante un máximo de 60 minutos.

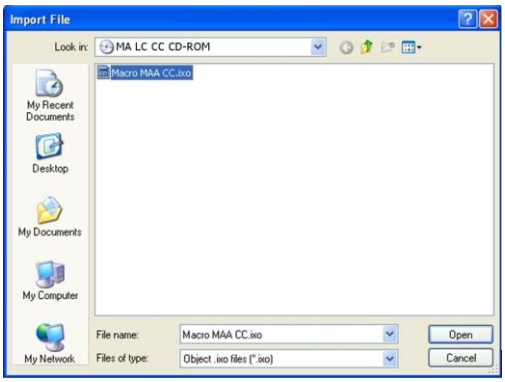
1.20 Después de la preparación de la PCR, asegúrese de que se limpie meticulosamente el área de trabajo usando reactivos descontaminantes de DNA.

## 2. Procesamiento de la serie analítica

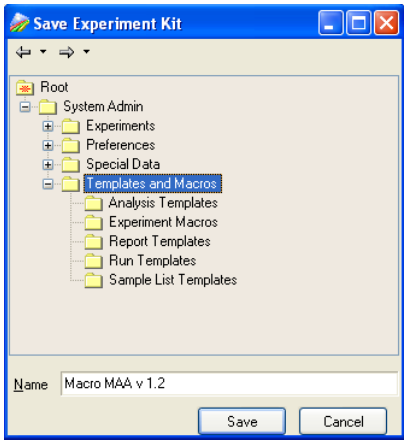
2.1 Inserte el CD-ROM MycAssay™ Aspergillus Myconostica Protocol.

2.2 Vaya a File, seleccione Import y seleccione Object .ixo files. Importe el archivo Macro MAA SERUM v1.ixo del CD en su base de datos.




2.3 Vaya a **File**, seleccione **Save** y guarde el macro en la ubicación deseada de su base de datos.

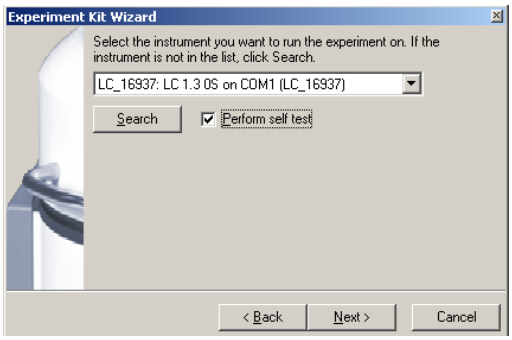



2.4 Seleccione la opción **Run Macro** de la barra de herramientas.

2.5 Seleccione el archivo de plantilla **Macro MAA SERUM v1.ixo** y pulse **Open**.

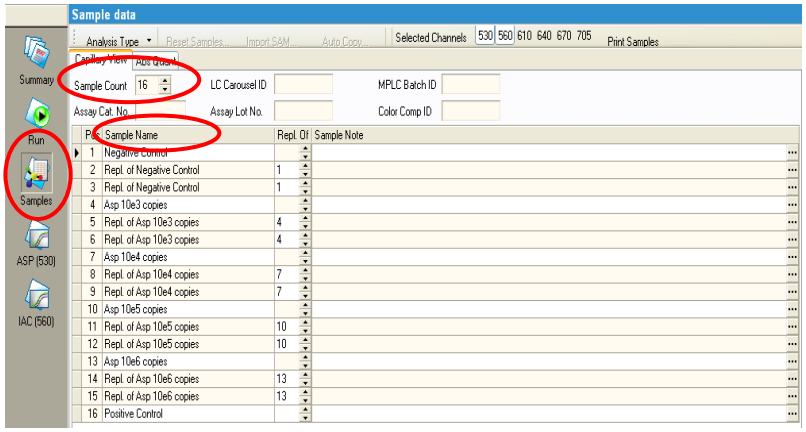
2.6 Siga las instrucciones del asistente. Seleccione la casilla **Perform Self-Test** si se trata de la primera serie analítica del día.

Experiment Kit Wizard
Welcome to the Experiment Kit Wizard.
The Experiment Kit Wizard helps you run a new experiment using the provided kit. The first step is to create the new experiment.
To start the wizard and create a new experiment, click Next.
If you don't want to create a new experiment at this time, click Cancel.
< Back
Next >
Cancel


Experiment Kit Wizard
Select the instrument you want to run the experiment on. If the instrument is not in the list, click Search.
LC_16937: LC 1.3 OS on COM1 (LC_16937)
Search
Perform self test
< Back
Next >
Cancel

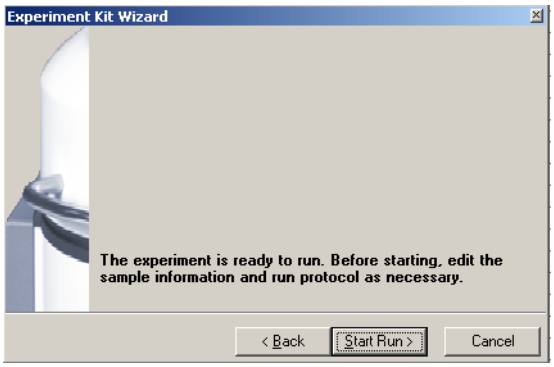
2.7 Asigne un nombre al archivo de la serie analítica y guárdelo en la ubicación deseada.

2.8 Vaya a la sección **Samples** haciendo clic en la ficha situada a la izquierda de la pantalla. Edite el número de la muestra en la casilla **Samples Count** y los nombres en la ficha **Capillary view**. Asigne a las muestras el nombre indicado en el plan del experimento correspondiente a la posición en el carrusel de muestras.




2.9 Introduzca el carrusel de centrifugado de muestras en el instrumento LightCycler® 2. Asegúrese de que la ranura debajo de la posición 1 de la muestra en el carrusel encaje en la clavija de la cámara térmica. Asegúrese de que el carrusel está firmemente insertado en la cámara y cierre la tapa.

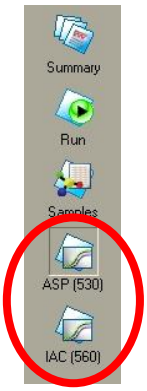
2.10 Cuando haya terminado, pulse el botón **Start Run**. Asegúrese de que el instrumento haya detectado todos los tubos capilares en el carrusel y que se haya iniciado el programa.



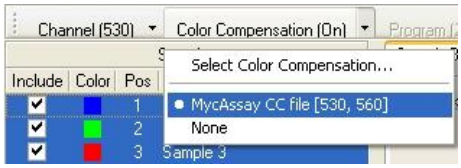

## 3. Análisis e interpretación de los datos

3.1 **Recuerde:** se debe aplicar un objeto de compensación de color antes de analizar los resultados de MycAssay™ Aspergillus en el LightCycler® 2.0. Si todavía no ha creado un objeto de compensación, hágalo ahora antes de continuar con el análisis y la interpretación de los datos.
Cuando haya finalizado la serie analítica, compruebe el contenido del informe visualizado e imprímalo si lo desea.

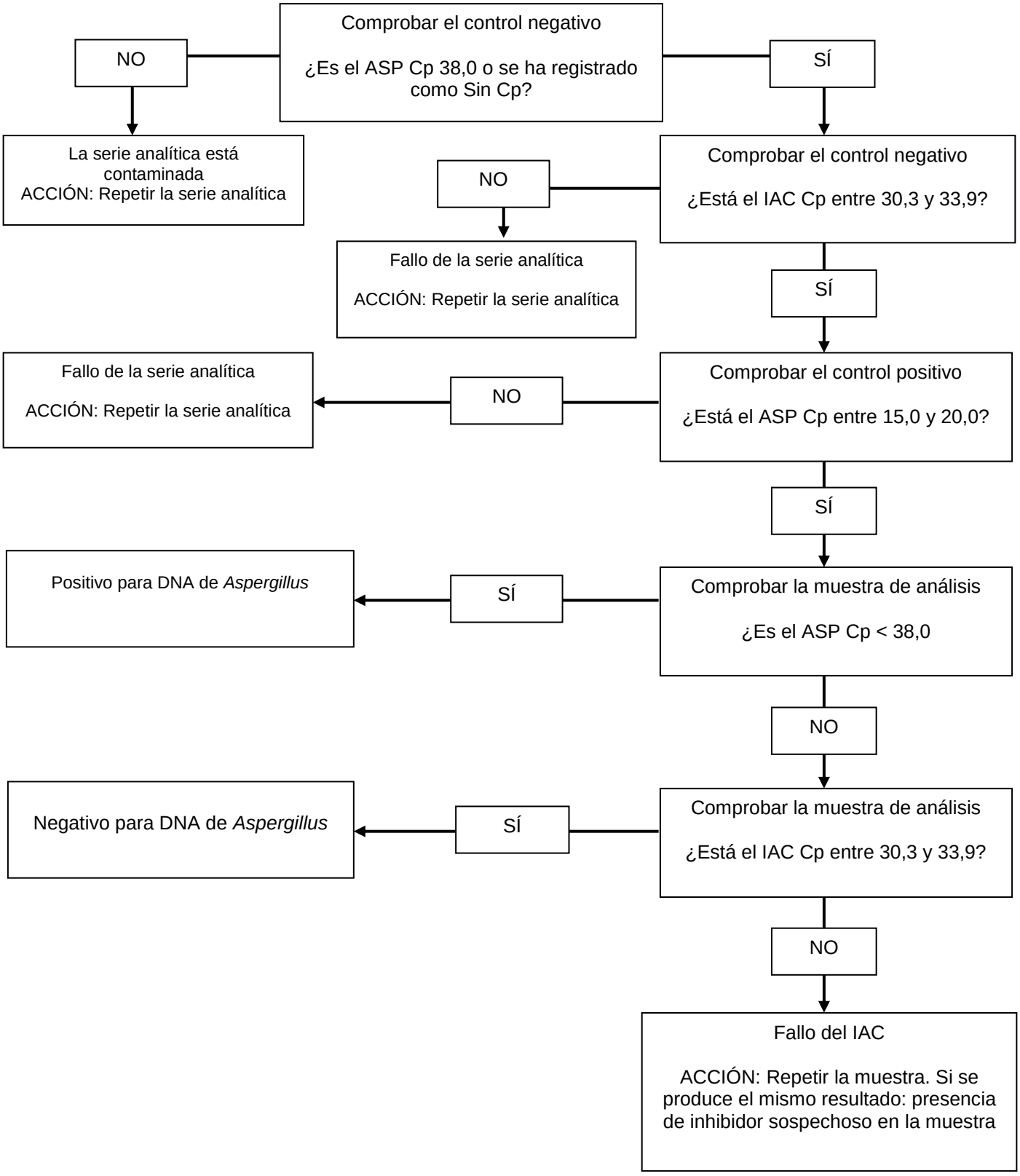
3.2 Los resultados de Aspergillus se pueden visualizar en la sección **ASP (530)** y los resultados IAC en la sección de análisis **IAC (560)**.




3.3 En las dos secciones, **ASP (530)** e **IAC (560)**, seleccione el archivo correcto de compensación del color (**MycAssay CC file**) que se debe aplicar al experimento.



3.4 Analice cada muestra, comenzando con los controles, como se muestra en la gráfica de flujo a continuación (también encontrará detalles en la tabla que aparece bajo la gráfica de flujo).


Comprobar el control negativo
¿Es el ASP Cp 38,0 o se ha registrado como Sin Cp?
NO
SÍ
La serie analítica está contaminada
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
Comprobar el control negativo
¿Está el IAC Cp entre 30,3 y 33,9?
NO
Fallo de la serie analítica
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
SÍ
Comprobar el control positivo
¿Está el ASP Cp entre 15,0 y 20,0?
NO
Fallo de la serie analítica
ACCIÓN: Repetir la serie analítica
SÍ
Comprobar la muestra de análisis
¿Es el ASP Cp < 38,0
SÍ
Positivo para DNA de *Aspergillus*
NO
Comprobar la muestra de análisis
¿Está el IAC Cp entre 30,3 y 33,9?
SÍ
Negativo para DNA de *Aspergillus*
NO
Fallo del IAC
ACCIÓN: Repetir la muestra. Si se produce el mismo resultado: presencia de inhibidor sospechoso en la muestra

| Muestra | Patógeno (530) Cp | IAC (560) Cp | Interpretación | Acción que debe realizarse |
|---|---|---|---|---|
| Control negativo | 38,0 o Sin Cp | Entre 30,3-33,9 | Control negativo aceptable | Los resultados del paciente son válidos |
| Control negativo | 38,0 o Sin Cp | <30,3 o >33,9 | Fallo en el control negativo | Repetir toda la serie analítica |
| Control negativo | <38,0 | Entre 30,3-33,9 | Contaminación | Repetir toda la serie analítica |
| Control positivo | Entre 15,0-20,0 | ND | Control positivo aceptable | Los resultados del paciente son válidos |
| Control positivo | <15,0 o >20,0 | ND | Fallo en el control positivo | Repetir toda la serie analítica |
| Muestra de paciente | ≥38,0 o Sin Cp | Entre 30,3-33,9 | Negativo para *Aspergillus* | Comunicar resultado: Resultado n.º 1 |
| Muestra de paciente | <38,0 | ND | Positivo para *Aspergillus* | Comunicar resultado: Resultado n.º 2 |
| Muestra de paciente | ≤ 38,0 o Sin Cp | <30,3 o >33,9 | Fallo del IAC en la muestra | Repetir la muestra: Resultado n.º 3 |

Consulte *Generación de informes clínicos* (Resultados n.º 1, n.º 2 o n.º 3).

## 4. Resolución de problemas

### 4.1 El control negativo ha generado una señal positiva en el canal ASP (530):

- Se produjo contaminación durante la preparación. No pueden considerarse precisos los resultados de toda la serie analítica.

→ Repita toda la serie analítica, teniendo gran cuidado al añadir las plantillas, en particular el control positivo (Tubo 4), para asegurarse de que no se produzca una contaminación cruzada.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos sean debidamente descontaminados antes y después de su uso.

- Se ha colocado incorrectamente el control negativo en el instrumento.

→ Anote correctamente los tubos capilares en el software.

### 4.2 El valor de Cp del IAC del control negativo se encuentra fuera del intervalo aceptable:

- Se ha inhibido la PCR.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos estén completamente secos después de usar agentes descontaminantes antes de proceder a la preparación para la PCR.

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la PCR o se ha añadido una cantidad dos veces mayor del Tubo 2.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más altos o más bajos de líquido en un tubo capilar de reacción en comparación con los otros.

- No se ha aplicado el archivo CC correcto a los datos.

→ Cree un archivo CC mediante el kit Myconostica MycAssay™ CC, aplíquelo a los resultados y vuelva a realizar el análisis. Para información detallada sobre el kit consulte a su distribuidor local.

**4.3 El control positivo es negativo:**

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- Se produjo un error durante el paso 1.11/1.13 y la plantilla de control positivo (Tubo 4) se colocó en el tubo de reacción erróneo.

→ Repita la serie analítica, teniendo extremo cuidado durante la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observa un nivel más alto de líquido en un tubo de reacción y un nivel más bajo en otro en comparación con el nivel normal.

- No se ha añadido el reactivo de los Tubos 1 ó 2 a la reacción.

→ Repita la serie analítica teniendo cuidado en la fase de preparación. Estos errores pueden detectarse si se observan niveles más bajos de líquido en este tubo capilar de reacción que en los otros.

- Se ha colocado incorrectamente el control positivo en el instrumento.

→ Anote correctamente los tubos capilares en el software.

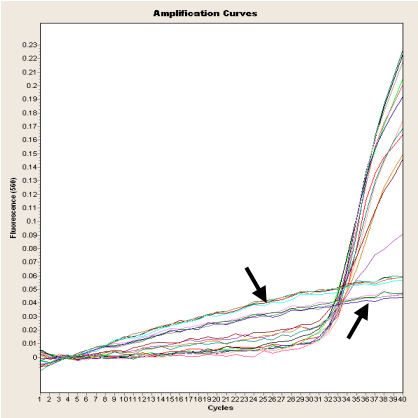
**4.4 La(s) muestra(s) de paciente son negativas y el IAC está fuera de rango (Resultado n° 3):**

- Es probable que la(s) muestra(s) de paciente contengan inhibidores de la PCR.

→ Para lograr una extracción óptima del DNA de las muestras recomendamos utilizar el kit High Pure según el método modificado que se indica en *Procedimientos de uso* y no según las instrucciones del fabricante.

→ Determinados tubos de recogida para el suero pueden contener inhibidores de PCR que todavía no se han estudiado.

**4.5 La muestra de paciente es negativa en la sección ASP (530) y la gráfica IAC (560) se aleja de forma significativa de la línea base normal (como se muestra en la imagen de ejemplo inferior; las flechas indican gráficas anómalas):**




- Se ha inhibido la reacción de PCR.

→ Asegúrese de que el área de trabajo y los instrumentos estén completamente secos después de usar agentes descontaminantes antes de proceder a la preparación para la PCR.

→ Analice de nuevo la muestra de paciente. Si el problema reaparece, el inhibidor de la PCR está presente en la muestra. Identifique la muestra como “Indeterminada” (Resultado 3).

**4.6 Los resultados en la sección IAC (560) coinciden casi exactamente con los resultados en la sección ASP (530).**

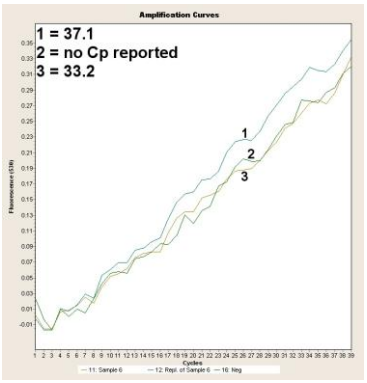
- No se ha aplicado ningún archivo de compensación de color o se ha aplicado un archivo de compensación de color incorrecto a los resultados del experimento.

→ Compruebe en las dos secciones de análisis si la compensación de color está activada y si se ha aplicado el mismo archivo MycAssay™ CC en los dos canales.

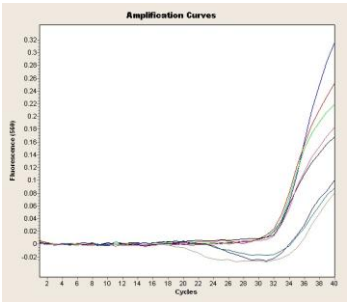
**4.7 La línea base para determinadas muestras coincide con el control negativo, indicando que no se ha producido ninguna amplificación. No obstante, el software ha presentado un valor Cp positivo (como muestra la figura inferior):**

- La emisión de un valor Cp positivo para una gráfica de amplificación negativa sólo se ha producido dos veces en 154 reacciones negativas realizadas durante los estudios de validación.

→ Si esto ocurre, repita el análisis de la(s) muestra(s) para confirmar el resultado *Negativo*.




**4.8 Al aplicar el objeto CC, algunos valores en el canal 560 IAC se reducen y aparecen valores Cp que se encuentran fuera del rango aceptable:**




- Esto es totalmente normal para las reacciones que contienen concentraciones elevadas de DNA diana y no interferirá en la interpretación de los resultados del paciente.

→ Siga el procedimiento de análisis normal; verá que para las muestras positivas para Aspergillus el resultado IAC no es necesario para decidir acerca del resultado para el paciente.

**4.9 No se obtienen resultados para ningún canal con ninguna muestra ni control:**

- Las condiciones de conservación del kit no cumplían las instrucciones presentadas en el apartado *Conservación* de estas instrucciones de uso o el kit ha caducado.

→ Compruebe que se hayan seguido las condiciones de conservación correctas del kit. Compruebe la fecha de caducidad de los reactivos (en la etiqueta de la bolsa/caja del kit) y repita el proceso con un kit que no haya caducado en caso necesario.

- El equipo usado no tiene un funcionamiento óptimo.

→ Compruebe que el instrumento de PCR en tiempo real tiene el historial de mantenimiento actualizado y que ha sido totalmente calibrado según se describe en su Guía de instalación y mantenimiento.

- Se ha utilizado un protocolo incorrecto durante la preparación del software.

→ Consulte la Sección 2 y elija el archivo del protocolo correcto, según se especifica para cada tipo/versión del software, del CD-ROM Myconostica Protocol. Sólo puede cargarse el archivo apropiado para el software. Repita la serie analítica usando el archivo del protocolo correcto.

Si tiene más preguntas o experimenta cualquier problema, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente (productsupport@lab21.com).

## Características de rendimiento y limitaciones

El kit se validó inicialmente para usarse con suero junto con el sistema Cepheid SmartCycler®. La sensibilidad analítica (límite de blanco) se estableció con la plataforma LightCycler® 2.0, utilizando tubos capilares de vidrio de 20 µL (Roche, n.º de catálogo 04929292001 ó 11909339001), y se describe a continuación. En los casos en los que no se esperaba que las diferencias entre las plataformas afectaran al rendimiento del ensayo y, por consiguiente, a la afirmación relativa al rendimiento, los demás estudios no se repitieron. Estos resultados, obtenidos utilizando la plataforma SmartCycler®, se consideran transferibles a la plataforma LightCycler® 2.0.

## Sensibilidad analítica

Mediante el protocolo LightCycler® 2.0 arriba descrito y las plantillas PCR generadas en Myconostica, se determinó un valor Cp de 38,0 para el LoB de MycAssay™ Aspergillus.

**Se establecieron las siguientes afirmaciones sobre el rendimiento para suero utilizando el sistema Cepheid SmartCycler®.**

## Selectividad analítica

La selectividad analítica se analizó usando DNA extraído de diversas especies fúngicas y no fúngicas. Las especies siguientes fueron analizadas durante la validación inicial para muestras respiratorias y no produjeron un resultado positivo:
*Alternaria alternata, Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis,* especies de *Cladosporium, Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Histoplasma capsulatum, Pneumocystis jirovecii, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum.* Las siguientes especies bacterianas no presentaron un resultado positivo: *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius*.

Se analizaron específicamente las especies siguientes para detectar su posible presencia en el suero sin obtener un resultado positivo:
*Acinetobacter baumannii, Aeromonas hydrophilia, Burkholderia cepacia, Citrobacter koseri, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Salmonela enterica, Serratia marcescens, Stenotrophmonas maltophila*.

El DNA genómico humano no presenta un resultado positivo con este ensayo.

## Límite de Detección

El límite de detección fue <25 copias de DNA diana utilizando la cepa AF293 de *A. fumigatus.*

## Sustancias que producen interferencia (contraindicaciones de uso)

Los siguientes compuestos fueron analizados a concentraciones clínicamente relevantes y se comprobó que no inhiben el ensayo: acetilcisteína, anfotericina, dipropionato de beclometasona, budesonida, colistimetato sódico, propionato de fluticasona, fumarato de formoterol dihidrato, bromuro de ipratropio, lidocaína, manitol, sulfato de salbutamol, salmeterol, cloruro sódico, cromoglicato sódico, terbutalina y tobramicina.

Se realizó un análisis para detectar la posible presencia de las siguientes sustancias en el suero. Se analizaron concentraciones clínicamente relevantes y se descubrió que no inhibían la reacción de PCR.
Amoxicilina con ácido clavulánico, atovaquona, azathioprine, aztreonam, ceftazidima, ciprofloxacina, maleato de clorfenamina, fosfato de clindamicina, cotrimoxazol, creatinina, dapsone, fosfato sódico de dexametasona, fluconazol, meropenem, metoclopramida hidrocloruro, paracetamol, fosfato de primaquina, fosfato sódico de prednisolona, prednisona, proclorperazina, vamcomicina y voriconazol.

Se determinó que las sustancias siguientes inhiben las reacciones de PCR: cefuroxima, heparina, metilprednisolona succinato sódico, transaminasa y urea. Cuando se añadieron estas sustancias inhibidoras en concentraciones

clínicamente relevantes al suero que contenía DNA de *Aspergillus* y se realizó la extracción con el kit modificado High Pure, no se observó ninguna inhibición. No obstante, la transaminasa pareció degradar el DNA de *Aspergillus* antes de la extracción, ya que el 25% de los duplicados fueron negativos para *Aspergillus*.

## Especificidad analítica

## La especificidad analítica se determinó inicialmente durante los estudios de validación para la utilización con muestras respiratorias y no se ha repetido.

La especificidad analítica se estudió usando DNA extraído de 15 especies diferentes de *Aspergillus*, entre las que se incluían varias cepas de cada una de las siguientes especies: *A. fumigatus, A. niger, A. terreus* y *A. nidulans*. Las señales detectadas por encima del LoB se registraron como un resultado positivo.

Las 15 especies de *Aspergillus* tuvieron un resultado positivo con el ensayo. Además de las especies anteriormente mencionadas se incluyen *A. flavus, A. versicolor, A. glaucus, A. sclerotiorum, A. niveus, A. lentulus, A. unguis, A. candidus, A. wentii, A. tubingensis* y *A. foetidus*.

El DNA genómico extraído de especies de *Penicillium* también generó resultados positivos. Esto se debe al hecho de que las secuencias de las dianas moleculares tienen un grado de conservación alto entre *Aspergillus* y *Penicillium*. Por consiguiente, debe señalarse que un resultado positivo con este ensayo puede deberse a una infección por *Penicillium* en lugar de a una infección por *Aspergillus*.

## Generación de informes clínicos

El kit MycAssay™ Aspergillus se ha diseñado para ser utilizado como ayuda para el diagnóstico. Los resultados deben considerarse en el contexto del estado clínico del paciente y de los resultados de otras pruebas diagnósticas.

Los siguientes son informes recomendados, que dependen de la interpretación del resultado del ensayo:

Resultado n.º 1
"Especies de *Aspergillus* no detectadas."

Resultado n.º 2
"Especies de *Aspergillus* detectadas; resultado positivo. Este ensayo también detecta especies de *Penicillium*."

Resultado n.º 3
"La prueba fracasó; inhibidores u otra sustancia desconocida presentes."

## Limitaciones del procedimiento

- La principal limitación de este procedimiento es la calidad de la muestra primaria:
  - Si las concentraciones séricas de DNA de *Aspergillus* son bajas, la eficacia de extracción puede afectar al resultado y la prueba puede proporcionar un resultado falso negativo.
  - Los datos preliminares indican que la congelación y el almacenamiento de las muestras de suero puede afectar a la cantidad de DNA viable para el ensayo.
  - No se dispone de datos sobre la estabilidad del DNA de *Aspergillus* en suero. Por ello se recomienda que las muestras se procesen lo más rápidamente posible tras la recogida.
  - No se dispone de datos sobre el rendimiento del suero recogido en tubos para la recogida de sangre diferentes a los tubos de recogida de suero Greiner Red Top recomendados.
  - No se dispone de datos sobre las características de rendimiento del ensayo iniciado con DNA de *Aspergillus* extraído del plasma o de sangre completa.

- Pueden producirse resultados positivos falsos si el agente infeccioso pertenece al género *Penicillium*, que no puede distinguirse del género *Aspergillus* con este kit.

- Aunque el método con el kit High Pure PCR Template Preparation puede eliminar los inhibidores de la PCR, no se han evaluado todos los fármacos ni poblaciones de pacientes.

- Durante los estudios de validación analítica, se detectó que la transaminasa en concentraciones de 22,2 U/0,5 mL de suero podría haber causado la degradación del DNA de *Aspergillus* antes de la extracción.

- Durante la validación se obtuvieron y se utilizaron lotes de proteinasa K que después resultaron estar contaminados (en la fuente) con *Aspergillus*. Seleccione cuidadosamente las fuentes de los materiales y utilice fuentes recomendadas siempre que sea posible.

- Pueden obtenerse resultados positivos falsos por contaminación externa de la muestra original o de la prueba. Esta contaminación podría provenir de aire contaminado con *Aspergillus*, de una técnica experimental deficiente con respecto al control positivo o de contaminación externa (especialmente de la pipeta) con DNA de *Aspergillus*.

- Dado que se puede obtener un resultado positivo verdadero en pacientes con una colonización transitoria o persistente por el género *Aspergillus*, se requiere aplicar el criterio clínico para interpretar los resultados de la prueba, en el contexto de la enfermedad.

## AUTORIZACIÓN DE COMERCIALIZACIÓN

TopTaq™ Hot Start es suministrado por QIAGEN. QIAGEN® es una marca registrada de Qiagen GmbH, Hilden, Alemania.

Este producto se vende bajo autorización del Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, Estados Unidos, y puede usarse bajo los derechos de la patente del PHRI exclusivamente para diagnóstico *in vitro* en seres humanos.

SmartCycler® es una marca registrada de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, Estados Unidos.

High Pure® es una marca registrada de Roche Diagnostics, GmbH, 68298 Mannheim, Alemania.

Parte de este producto está cubierta por una licencia exclusiva a una solicitud de patente propiedad del Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, Estados Unidos.

LightCycler® es una marca registrada de Roche Diagnostics, GmbH.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882
Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE